Reagente Proteína C

Campo de aplicação - O Reagente Proteína C é um teste coagulométrica para a determinação quantitativa da atividade da proteína C no plasma humano.

Significado diagnóstico - A proteína C é um inibidor da coagulação dependente da vitamina K, que regula a atividade dos fatores de coagulação V e VIII. A deficiência heterozigótica congênita provoca uma incidência elevada de tromboses venosas (1,2) em função da idade. A deficiência adquirida pode ser condicionada pela deficiência de vitamina K, por exemplo, devido a distúrbios de reabsorção ou anticoagulação oral. Uma vez que, em caso de deficiência de vitamina K, a atividade de outros fatores de coagulação dependentes da vitamina K também fica diminuída, o risco de trombose nessas circunstâncias é pequeno. Devido ao curto período de semi-desintegração da proteína C, no início da anti-coagulação oral podem registrar-se atividades de proteína C muito reduzidas e perigo de necroses induzidas pela cumarina. O Reagente Proteína C detecta as funções essenciais da proteína C ativada, tais como a proteólise dos fatores V e VIII e a ação recíproca com a proteína S. A proteína C sintetizada sob efeito da deficiência da vitamina K não é detectada e, por isso, foi encontrada uma atividade de proteína C mais baixa do que com os métodos cromógenos.

Princípio metodológico - A proteína C da amostra do paciente é ativada com a adição de um veneno de víbora específico contido no Reagente ativador da Proteína C. A proteína C ativada inibe os fatores V e VIII do plasma adicionado com deficiência de proteína C. Esta inibição prolonga o teste APTT intercalado.
Assim, o prolongamento do APTT constitui a medida do teor de proteína C da amostra do paciente.
Através da diluição prévia e progressiva de um plasma calibrador, pode estabelecer-se uma curva de referência, na qual pode ser lido o conteúdo de proteína C da amostra do paciente, em percentagem da norma.

Reagentes
Conteúdo da embalagem comercial
Kit de teste, ref. OQYG
1 x para 3 ml de Ativador da Proteína C
1 x 10 ml de Reagente APTT para Proteína C
4 x para 1 ml de plasma deficiente em Proteína C

Composição - Ativador de proteína C, liofilizado: Extrato do veneno de Agkistrodon contortrix, estabilizado.
Reagente APTT para a proteína C, líquido, o tampão contém fosfolipídios purificados do grão de soja, ácido elágico;
Estabilizadores e aprox. 0,15 % de fenol como conservante.

Plasma deficiente em proteína C, liofilizado: plasma citratado humano com um teor de proteína C < 1%, com solução tampão Hepes (17 mmol/l) estabilizado, contém o neutralizador de heparina brometo de hexadimetrina (5mg/l).
Advertências e medidas de precaução

1. Só para uso diagnóstico in vitro.

2. Cada dádiva individual de sangue destinada à preparação de plasma deficiente em proteína C foi previamente examinada com vista à detecção de HBsAg, Anti-HCV, Anti-HIV1 e Anti-HIV2. Na preparação só são utilizadas dádivas com resultado negativo. Independentemente disso, todos os materiais obtidos a partir do sangue humano devem ser manuseados com as precauções devidas, seguindo as medidas de segurança recomendadas em caso de risco biológico, uma vez que nunca se pode excluir inteiramente o risco de contaminação por agentes patogênicos (3).

Preparação dos reagentes - Dissolver a ativador da proteína C em 3 ml de água destilada. Dissolver o plasma deficiente em proteína C em 1 ml de água destilada, agitando cuidadosamente.

Aquecer o reagente APTT para a proteína C até à temperatura ambiente (+15 a +25ºC). Após uma breve mistura evitando-se a formação de espuma, o reagente fica pronto para uso. Se o reagente APTT for deixado em repouso, pode ocorrer a formação de uma precipitação verde de ácido elágico e lípidos. Por isso, imediatamente antes do uso, favor proceder à re-suspensão!
Aquecer a solução de cloreto de cálcio num tubinho de ensaio a +37ºC. Antes de usar, deixar repousar todos os outros reagentes à temperatura ambiente (+15 a + 25ºC) durante 10 minutos, no mínimo.

Estabilidade e condições de conservação - Não aberto e conservado entre +2 bis +8 ºC, o kit de teste pode ser utilizado até à data indicada no rótulo.
Estabilidade após a reconstituição ou primeira abertura (no frasco novamente fechado):

Temperatura	**Ativador da proteína C**	**Reagente APTT**	**Plasma def. em proteína C**
£-18 °C	7 dias	-	7 dias
entre + 2 e +8°C	2 dias	7 dias	-
entre +15 e +25°C	8 horas	24 horas	8 horas

Após a reconstituição, o ativador da proteína C e o plasma deficiente em proteína C podem ser congelados e descongelados mais uma vez no frasco original.
O plasma deficiente em proteína C congelado, tem de ser descongelado durante 10 minutos à temperatura de +37C e, até à medição, não dever ser conservado entre +15 e +25º C, durante um período de tempo superior a 2 horas.

Nota: O reagente APTT para a proteína C não pode ser congelado!
Os diversos aparelhos de medição de coagulação possuem características de estabilidade individuais.

Outros materiais necessários
Solução tampão Imidazol, ref. OQAA (para o método manual e alguns aparelhos semi-automáticos)
Solução de cloreto de cálcio 0,025 mol/l, ref. ORHO
Plasma humano standard, ref. ORKL
Plasma de controle N, ref. ORKE
Plasma de controle P, ref. OUPZ
Água destilada
Tubinhos de ensaio em plástico
Aparelho de medição da coagulação (vide o capítulo Limitações de execução do teste)

Material de análise - Para a obtenção de plasma, misturar cuidadosamente 1 parte de solução de citrato de sódio (0,11 mol/l) com 9 partes de sangue venoso, evitando a formação de espuma. Centrifugar, imediatamente, durante 10 min. no mínimo, com 1500 x g no mínimo e remover o plasma sobrenadante. As amostras de plasma fresco podem ser conservadas durante 4 horas, no máximo, a uma temperatura entre +15 e +25ºC.

Estabilidade da amostra:

entre +15 e +25°C	4 horas
£- 18 °C	1 mês

Descongelar durante 10 minutos as amostras de plasma conservadas a uma temperatura de -18 ºC e executar a determinação durante um período de tempo de 2 horas. As amostras só podem ser congeladas uma vez!

Metodologia - O Reagente Proteína C pode ser usado numa multiplicidade de aparelhos de medição de coagulação. Consultar o manual de instruções do fabricante do aparelho!

Execução manual do teste - Diluir a amostra do paciente com a solução tampão Imidazol na relação 1 + 9.
As pré-diluições deverão ser utilizadas num período de tempo de 10 minutos.
Pipetar os reagentes seguintes para um tubinho de ensaio aquecido, previamente, a +37ºC:

Amostra do paciente (diluído com 1+9)	50 µl
Plasma deficiente em proteína C	50 µl
Ativador da proteína C	50 µl
Reagente APTT para proteína C	50 µl
Misturar e deixar incubar durante exatamente 4 minutos, a +37°C	
Solução de cloreto de cálcio (+37°C)	50 µl

Com a adição da solução de cloreto de cálcio, pôr em marcha o cronômetro ou ponto de medição no aparelho de medição da coagulação e determinar o tempo de coagulação.

Nota: Não é permitida a alteração da seqüência da pipetagem.

Calibração - Para estabelecimento da curva de referência, utiliza-se um plasma calibrador com indicação dos valores nominais para a proteína C, (p.ex., plasma humano standard da Dade Behring, ref. ORKL).
O valor nominal indicado para o plasma calibrador é específico do lote e, por isso, é necessário consultar a tabela de valores nominais!
Para estabelecer a curva de referência, são preparadas diluições manuais do plasma calibrador, em tubinhos de plástico, primeiro com plasma deficiente e, na fase de diluição seguinte, com tampão Imidazol.
Sugerem-se os seguintes pontos de calibração: 150 %, 100%, 75%, 50%, 33%, 10% da norma da atividade de proteína C. As diluições obtêm-se de acordo com as indicações de volume da tabela seguinte (considera-se que o plasma calibrador perfaz 100% da norma das atividades de proteína C):

		1ª Fase de diluição		**2ª Fase de diluição**	
Fator de multiplicação*	**Diluição**	**Plasma calibrador (µl)**	**Plasma deficiente (µl)**	**Diluição do calibrador dom plasma def. (ml)**	**Solução tampão Imidazol (ml)**
1,50	1:6, 7	60	-	-	340
1,00	1:10	50	-	-	450
0,75	1:13,3	150	50	50	450
0,50	1:20	50	50	50	450
0,33	1:30,3	50	100	50	450
0,10	1:100	20	180	50	450

* Cálculo da atividade da proteína C (%) das amostras individuais multiplicando o valor nominal para o plasma calibrador, pelos fatores de multiplicação indicados.
Seguidamente, os tempos de coagulação são medidos com determinações duplas, conforme descrito em "Execução manual do teste". Para esse efeito, em vez de 50 µl de plasma de paciente pré-diluído, são utilizados 50 µl da respectiva diluição do calibrador. A curva de referência tem de ser estabelecida de novo para cada mudança de aparelho e cada lote de Reagente proteína C.

Execução automática do teste - A pedido, a Dade Behring fornece instruções especiais para os aparelhos de medição da coagulação.

Controle de qualidade interno - Intervalo normal: Plasma de controle N
Intervalo patológico: Plasma de controle P
Em cada dia de teste, deverão ser medidos dois controles (um no intervalo normal e um no intervalo patológico), no mínimo de 8 em 8 horas. O material de controlo deverá ser tratado como a amostra. Cada laboratório deverá definir o seu intervalo próprio de controlo de qualidade, com base nos valores nominais e intervalos indicados pelo fabricante dos controles, ou com base em valores de controlo definidos no laboratório. Se o valor de

controlo medido se situar fora do intervalo de confiança definido anteriormente, os reagentes, o aparelho de medição da coagulação e a curva de referência terão de ser controlados.

Resultados - A concentração de proteína C é calculada e impressa automaticamente pelo aparelho em % da norma, com base na curva de referência. Os resultados deverão referir-se ao intervalo de referência para a determinação da proteína C no respectivo laboratório.

Limitações de execução do teste - Os aparelhos de medição da coagulação para os quais a Dade Behring disponibiliza instruções de utilização são apropriados para executar as determinações. A utilização do Reagente Proteína C noutros aparelhos de medição da coagulação deverá ser validada pelo laboratório de análise. Neste caso, podem obter-se dados de desempenho diferentes dos indicados. Com base no princípio de medição (APTT modificado), as atividades fortemente elevadas do fator de coagulação VIII expressam valores baixos de proteína C (4). A presença de uma mutação do fator V no ponto de desagregação da proteína Ca (doença do fator V) pode provocar igualmente uma recuperação reduzida da proteína C (5,6). A heparina numa concentração até 2 U/ml não provoca qualquer afetação dos resultados. Os anticoagulantes de Lupus podem provocar um distúrbio e simulam concentrações aparentemente mais elevadas de proteína C, sob a forma de tempos de coagulação prolongados 7,8).
As amostras hemolizadas não são apropriadas para a determinação de proteína C.

Intervalo de referência - O intervalo de referência vai de 70 a 140% do normal (9).
Os valores de referência para os indivíduos saudáveis podem variar de laboratório para laboratório, em função da técnica utilizada. Por isso, é aconselhável que cada laboratório defina o seu intervalo de referência próprio para a respectiva população de pacientes, com base na técnica empregue e nos aparelhos utilizados.

Características de desempenho do teste
Intervalo de medição - O Reagente de Proteína C vai de 10 a 140% do normal.

Precisão - Foram executados estudos sobre a precisão no sistema BCS. Foram avaliados 2 controles e 2 plasmas humanos com teor de proteína C normal e patológico, em conformidade com a diretiva EP5-A dos NCCLS. Para a determinação da atividade de proteína C em % da norma, o coeficiente de variação na série (precisão Intra-Assay) situou-se entre 1,4 e 2,5% e o coeficiente de variação de dia a dia (precisão Inter-Assay) situou-se entre 1,1 e 4,7%.

Comparação de métodos - O reagente de Proteína C foi comparado com um teste coagulométrica de proteína C disponível no mercado. Foram analisados 86 plasmas no intervalo de concentração de 11 a 125%. Neste caso, obteve-se um coeficiente de correlação de 0,99, um segmento axial de 4,49 e um aumento de 0,91.
Os dados citados para as características de desempenho do teste apresentam resultados típicos e não podem ser considerados como especificações para o teste do reagente Proteína C.

Bibliografia: BCS é uma marca registrada da Dade Behring Marburg GmbH nos EUA, na Alemanha e noutros países.

Diagnóstica São Paulo Produtos e Equipamentos para Laboratórios Ltda.
Av. Indianópolis, 3213 1º andar - Telefax: 5581-0157.
Site: diagnosticasp.com.br - Email: diagnosticasp@sti.com.br